

**PHENYLDIAZIRINE COMPOUND AND PHOTOAFFINITY REAGENT****Publication number:** JP2000319262 (A)**Also published as:****Publication date:** 2000-11-21

JP3746181 (B2)

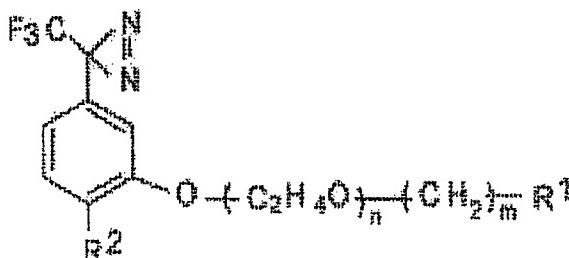
**Inventor(s):** HATANAKA YASUMARU +**Applicant(s):** SEIKAGAKU KOGYO CO LTD +**Classification:**

- international: C07D229/02; C07D403/12; C07D495/04; C07H1/00; C07H5/04;  
 G01N33/53; G01N33/532; G01N33/566; C07D229/00;  
 C07D403/00; C07D495/00; C07H1/00; C07H5/00; G01N33/53;  
 G01N33/532; G01N33/566; (IPC1-7): C07D229/02; C07D403/12;  
 C07D495/04; C07H1/00; C07H5/04; G01N33/53; G01N33/532;  
 G01N33/566

- European:

**Application number:** JP20000059547 20000303**Priority number(s):** JP20000059547 20000303; JP19990057255 19990304**Abstract of JP 2000319262 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a novel compound useful as a synthetic intermediate for a stable and useful biotinylated phenyldiazirine compound for simply producing photoaffinity reagents. **SOLUTION:** A compound expressed by the formula R1 is NHP1 (P1 is an amino-protective group), COX1 [X1 is an alkoxy, OH, NSO<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-CO-X<sub>3</sub> (X<sub>2</sub> is an arylene or alkylene; X<sub>3</sub> is an alkoxy or OH)]; R2 is an aldehyde, a lower hydroxy alkyl, a halogenated lower alkyl, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-O-NHP1 (x is 1-4) or the like; m is 1-4; n is 1-6), e.g. 2-[2-[2-(2-tert-butoxycarbonylaminoethoxy) ethoxyethoxy]-4-[3-(tri f luoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzyloxyphthalamide). The compound of the formula is produced, e.g. by using [2-methoxy-4-(1-azi-2,2,2- trifluoroethyl) benzaldehyde] as a starting raw material.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-319262

(式中、 $R^3$ は、フタルimid基、アミノ基、 $-NH_2P'$ 、 $^3$   
又はアミノ基の塩を表し、 $P'$ はアミノ保護基を表し、 $^4$   
 $m$ は1～4の整数を表し、 $n$ は1～6の整数を表し、 $X$   
はアーレン基又はアルキレン基を表し、 $Z$ はヘテロ  
原子で中断されてもよい炭素数1～20のアルキレ\*

## 【請求項5】

下記一般式(I)で表される錯結合ビオ  
チン化フェニルジアジン化合物。

【(5)】

【(5)】

上記一般式(I)で表されるビオチン  
化フェニルジアジン化合物と還元末端を有する錯化合  
物を反応させ、該還元末端を有する錯合物の還元末端  
のアルdehyド基と藻ビオチン化フェニルジアジン化合  
物のアミノ基とのシップ塩を形成させることを含む上  
記一般式(I)で表される錯結合ビオチン化フェニルジ  
アジン化合物の製造方法。但し、上記一般式(I)中、 $R$   
は、アミノ基、又はアミノ基の塩を表す。

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

【(5)】

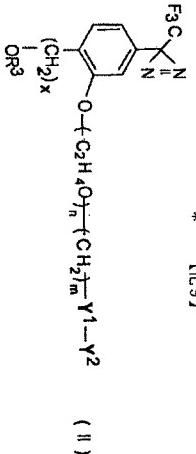
少なくとも一つで表される糖結合ビオチン化フェニルジアリン化合物に行し、他の型では、該一般式(I)～(IV)の少なくとも一つで表される化合物を含む光反応活性標識試験、及び後、般式(V)～(VII)の少なくとも一つで表される糖結合ビオチン化フェニルジアリン化合物からなる光吸収性標識試験に存する。本発明の更なる宗旨は、一般式(I)～(IV)の少なくとも一つで表されるビオチン化フェニルジアリン化合物に選元未端を有する糖結合化合物を反応させることによる、般式(I)～(VII)の少なくとも一つで表される糖結合ビオチン化フェニルジアリン化合物の製造方法及びこれらの透析結合ビオチン化フェニルジアリン化合物を用いる糖受容体の標識方法に存する。

【0006】 本発明における光吸収性標識試験装置及びその形態】 本発明における光吸収性標識試験装置は、本発明の目的を達成するための中間体化合物として構成する化合物を生成するための中間体化合物としては、本質的には糖受容体蛋白質を光反応により標識しておる。ラベル化蛋白質とビオチンを緩和な条件で切り離す事が出来るよう切断性を有するスペーサーを介して結合させるのが好ましく、例えば、アシルスルホンアミド等の切断性ペースターを、ボリオキシエチルスルホン基導入したスペーサーを介してビオチンをベンゼン核に連結させることが出来る。

【0008】 本発明の上記一般式(I)で表される光吸収性標識化合物は、この説明のビオチン化フェニルジアリン化合物は、この説明の下記一般式(I)で表される化合物は、下記一般式(I)で表される化合物は、該一般式(I)で表されるビオチン化フェニルジアリン化合物を合成するための中間体化合物である。本発明の下記一般式(I)で表される化合物は、アミノ基又はアルキレン基のスペーサーを介してベンゼン核結合し、且つリガンドとの結合能に及ぼすシアシン型の安息香基による影響を少な\*

\*くするために光反応基の結合位に対しP-位に結合している。

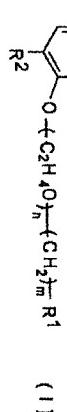
\* 【0013】



【0007】 又、標識化合物を有する基は、ボリオキシエチレン基等を含む親水性スペーザーを介して標識化合物、例えばビオチンがベンゼン核に結合されている。その際、標識化合物、即ちビオチンはスペーザーの末端アミノ基を介してベンゼン核に結合することができる。一方、ビオチン化された糖受容体(ラベル化蛋白質)をアセチル化抗体(抗ビオチン)を用いてアフィニティー精製し、再遊離、回収を所望する場合、分離・精製に通常使用される固定化ビオチンとビオチンとの結合力が強く、ラベル化蛋白質の回収率が低下することがあるので、ラベル化蛋白質とビオチンを緩和な条件で切り離す事が出来るよう切断性を有するスペーサーを介して結合させるのが好ましく、例えば、アシルスルホンアミド等の切断性ペースターを、ボリオキシエチルスルホン基導入したスペーサーを介してビオチンをベンゼン核に連結させることが出来る。

【0008】 本発明の上記一般式(I)で表される光吸収性標識化合物は、この説明のビオチン化フェニルジアリン化合物は、この説明の下記一般式(I)で表される化合物は、下記一般式(I)で表される化合物は、該一般式(I)で表されるビオチン化フェニルジアリン化合物を合成するための中間体化合物である。新規化合物である。

【0009】



【0010】 一般式(I)中、R'は-NHP'又は-COXを表し、Rは、アカルヒド基、ヒドロキシ低級アルキル基、ヒドロキシ低級アルキル基、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-NHP'を表し、Pはアミノ保護基を表し、Xはアカルキシ基、ヒドロキシ基、又は-CO<sub>2</sub>Xを表し、Yはアリーレン基又はヒドロキシ基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、nは1～6、好ましくは1～2の整数を表し、xは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、yは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、P'はアミノ保護基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、Y'はビオチン又はビオチン標識基を表し、P'はアミノ保護基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、Y'はビオチンの未端基(-OH)かアミノ基又はカルボキシル基と反応し得る基に置き換わったビオチンを表し、X'はアリーレン基及びアルキレン基は上記一般式(I)におけるものと同義を表す。本発明でビオチン標識化合物を表す、アミノ基の端としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸の塩、或いは酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、メタヌスルホン酸等の有機酸の塩が挙げられる。これらの中、トリフルオロ酢酸は、一般式(I)の化合物を生成するのに有利である。

【0011】 Y'は-NH又は-COONHSO<sub>2</sub>-X'を表し、t-ブトキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、ベニルオキシカルボニル基、p-トルエンスルホニル基、9-フルオレニルメチオキシカルボニル基、トリチル基、ブタヨリ基、0-ニトロフェニルスルフニル基、3-ニトロ-2-ビリジンスルフニル基が挙げられる。これらの内t-ブトキシカルボニル基が簡便である。

【0012】 本発明のビオチン化フェニルジアリン化合物は、下記一般式(I)で表される化合物であり、上記一般式(I)の化合物をビオチン化し、所望によりR'基、ペントキン基等が挙げられる。アリーレン基として、(ボリ)オキシエチレン基等が挙げられる。qは0～50の整数を表す。

【0013】 本発明において、低級アルキル基とは、メチル基、エチル基、プロピル基等の炭素数1～4のアルキル基を表し、直鎖状が好ましい。また、アルコキシ基としては、炭素数1～6のアルコキシ基であり、例えはメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、ペントキン基等が挙げられる。

【0014】 一般式(I)中、R'は、アミノ基又は-COXを表し、Rは、アカルヒド基、ヒドロキシ低級アルキル基、ヒドロキシ低級アルキル基、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-NHP'を表し、Pはアミノ保護基を表し、Xはアカルキシ基、ヒドロキシ基、又は-CO<sub>2</sub>Xを表し、Yはアリーレン基又はヒドロキシ基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、nは1～6、好ましくは1～2の整数を表し、xは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、P'はアミノ保護基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、Y'はビオチン又はビオチン標識基を表し、P'はアミノ保護基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、Y'はビオチンの未端基(-OH)かアミノ基又はカルボキシル基と反応し得る基に置き換わったビオチンを表し、X'はアリーレン基及びアルキレン基は上記一般式(I)におけるものと同義を表す。本発明でビオチン標識化合物を表す、アミノ基の端としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸の塩、或いは酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、メタヌスルホン酸等の有機酸の塩が挙げられる。これらの中、トリフルオロ酢酸は、一般式(I)の化合物を生成するのに有利である。

【0015】 Y'は-NH又は-COONHSO<sub>2</sub>-X'を表し、t-ブトキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、ベニルオキシカルボニル基、p-トルエンスルホニル基、9-フルオレニルメチオキシカルボニル基、トリチル基、ブタヨリ基、0-ニトロフェニルスルフニル基、3-ニトロ-2-ビリジンスルフニル基が挙げられる。

【0016】 Y'は-NH又は-COONHSO<sub>2</sub>-X'を表し、t-ブトキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、ベニルオキシカルボニル基、p-トルエンスルホニル基、9-フルオレニルメチオキシカルボニル基、トリチル基、ブタヨリ基、0-ニトロフェニルスルフニル基、3-ニトロ-2-ビリジンスルフニル基が挙げられる。

【0017】 一般式(I)中、R'、P'、m、n及びY'は、上記一般式(I)におけるものと同義を表す。

【0018】 本発明の下記一般式(I)～(VII)で表される、糖結合ビオチン化フェニルジアリン化合物は、一般的(I)～(VII)において、末端アミノ基又はアミノ保護基を有するビオチン化フェニルジアリン化合物表し、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、(ボリ)オキシエチレン基等が挙げられる。qは0～50の整数を表す。

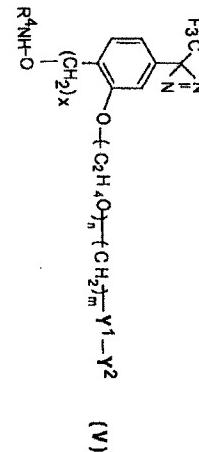


【0019】 一般式(IV)中、R'、P'、m、n及びY'は、上記一般式(I)におけるものと同義を表す。

【0020】 本発明の下記一般式(I)～(VII)で表される、糖結合ビオチン化フェニルジアリン化合物は、一般的(I)～(VII)において、末端アミノ基又はアミノ保護基を有するビオチン化フェニルジアリン化合物表し、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、(ボリ)オキシエチレン基等が挙げられる。qは0～50の整数を表す。

[6100]

\* \* [化 2]



卷之三

一般式(VI)中、R'、m、n、xは上記一般式(V)におけるものと同義を表す。★ [B14]

$$\begin{array}{c}
 \text{Fe}^{\text{III}} \\
 | \\
 \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}_2\text{H}_4 \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{CONHSO}_2 \text{---} \text{X}^2 \text{---} \text{CONH-Z}^q \text{---} \text{N}^{\text{H}} \text{---} \text{O} \\
 | \\
 \text{H} \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{S} \\
 | \\
 \text{H} \text{---} \text{C} \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C} \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\
 | \\
 \text{H}
 \end{array}$$

一般式 (VII) 中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、m、n、x 及び X<sup>2</sup> は、上記一般式 (IV) におけるものと同義を表し、Z 及び q は、上記一般式 (V) におけるものと同義を表す。一般式 (VII) で示される化合物は、切断性スベーサーを有する複合化合物オチナンフュニルジアミン化物であり、特に X<sup>2</sup> がフェニレン基、q=0 の場合は、ラベル蛋白質の分離・回収に有用な光親和性標識試薬を構成する化合物として好ましい。

【0.2.3】一般式 (III) ～(VI) で示される化合物と反応させる錯合化合物は、選択末端を有する多糖類、オリゴ糖類、单糖類、例へば、ムチン型糖類、A 型糖類、シアルリ糖類、グリコサミノグリカン、ラクトサミン、N-アセチルラクトサミン、ラクトサミンオリゴ糖、シアリルラクトサミン、グルカン、マンナン、フルクタ

50 40

は選択的  
【002

で示される難結合ビオチン化フェニルアジン化合物を生成する。そして、この化合物によって本剤の光活性と性標識試薬は、この化合物の機能を発揮することができる。該試薬は、この化合物の機能を発揮する限りで、難結合、安速化剤、塩基の添加物を含んでいてもよい。また、一般式(11)～(IV)の化合物のオキシアミノ基は、アルデヒド基以外にケトン基、カルボキシル基とも結合し得るので、難結合化合物がこれらの反応基を有する場合はその官能基とオキシアミノ基が反応してよい。なお、光親和性標識試薬とは、広義には、光反応性化合物にリガンドを結合した標識試薬を指すが、本明細書において「光親和性標識試薬」とは、光反応性糖受容体親和性標識試薬を意味するものとし、糖受容体とは糖と親和性を有する、すなわち糖との特異的な相互作用により糖に結合性を示す蛋白質を意味し、一般的には糖質的約レクチン、レセプター、酵素、抗体などを包含する。

【0012】本発明の光親和性標識試薬と種々の蛋白質を含む混合系において、該標識試薬の難結合化合物と糖受容体との相互作用をおこなわせると同時に又はその後に、光を照射すると、光親和性標識試薬の難結合化合物に特異的に相互作用する蛋白質（糖受容体）の、該結合化合物との相互作用部位（アミノ酸）、即ち標識試薬のアジアリン基が光反応によりクロスリンクする。更に、このビオチンを介する該蛋白質と性標識試薬でラベル化された蛋白質（ラベル化蛋白質）は、ビオチンを検出する自体公知の検出系

50

【0027】本剤の一概式 (II) で示され、オキシアミノ基でフェニル基骨格に有する光反応性ビオチン化フェニルアジン化合物に、そのオキシアミノ基、ケト基、カルボキシル基などを有するか、或いは必要に応じこれらの基團が導入された薬物或いは難結合化合物の生体由来成分をリガンドとして結合させることにより、広義な意味での光親和性標識試薬に譲り換えることができる。そして、この試薬は、難結合化合物の生体由来物質に、蛋白質あるいは難結合化合物のプローブとみなされ、親和性を持つ蛋白質の構造解析のプローブともなり又難結合も可能とする。この様にして、多種多様なリガントを接続する手法を得ることができプローブライナーリー、質量分析装置による超微量解析と組み合わせる応用は、蛋白質機能の高速度・高精度解析への展望を開くものとして期待される。従って、一般式 (II) で示される本明細書は極めて広範な有用性を有する化合物である。

【0028】本発明化合物の合成の一例を図1～6に示す反応スキームに基づいて以下に説明する。まず、図1に示す反応工程に従い、一般式 (I) で示される本明細書に記載の原料、即ち、化合物(4)～(7)の合成工事を説明する。

出発原料である化合物(4)～(7)の合成工法は、2-カルボキシ-4-(1-ブロモ-1-メチルエチル)-5-イソブチル-2-オキソ-4-ヒドロ-2H-1,3-オキセターン-1,3-ジカルボン酸ペルヒド<sup>1)</sup>は、糖本らの方法(日本特許第53-11974号)によれば、

ashimoto, Y., Kanbara, Y., Hayanaka, M., Heterocycles, 46, 119-122(1997)により調製することができる。化合物(I)

<p><b>[糖化合物残基]</b> <math>-CH=N-O-</math> [アツアツ'リソルビド]</p> <p><math>\downarrow</math></p> <p><b>[糖化合物残基]</b> <math>-CH-NH-O-</math> [アツアツ'リソルビド]</p> <p><math>\uparrow</math></p>	<p><b>[糖化合物残基] <math>-CH=N-O-</math> [アツアツ'リソルビド]</b></p> <p><math>+ NH_3O-[アツアツ'リソルビド]</math></p>
<p><b>【0025】</b>本発明の一式(Ⅰ)～(Ⅶ)で示される化合物において、R<sub>1</sub>がアミノ基又はアミノ基の塩である化合物と、還元末端を有する糖化合物との反応は、H液存性であり、該反応は強酸性下で進行する。通常反応はpH 1～7で進行するが、好ましくは緩衝液を用いるpH 4～5に調整されて行われる。本発明の一式(Ⅰ)～(Ⅶ)で示される光反応性ビチオナン化フェニルジアリソルビドの一種は、そのフェニル骨格にスペーサーを介してオキシアミノ基が導入されている特徴を有し、このオキシアミノ基は、還元末端を有する糖化合物の還元末端のアルデヒドと、新規水銀の保護など特に必要な場合にアルカリ性試薬等を用いて保護する必要がある。それ故、新規開端蛋白質の構造及び機能解析に極めて有用なプローブ又は精製手段となることが期待されるのでシップ盤型形成反応により結合し、一般式(Ⅰ)～(Ⅶ)</p>	<p>によって高濃度での検出が可能であり、アビシン、ストレアピアビシン等を粗体に結合したアビシンカラムを乱用することにより、アフィニティーコマドグライマーによって「活性蛋白質」を容易に精製することが可能になる。更に、本発明においては、光親和性スペーサーを介して結合された化合物を適用することにより、アビシンカラムによるアフィニティーコマドグライマーを行う際、緩和条件でオチオチオン部分を容易に切り離すことができる、目的蛋白質を高い回収率で取得することが可能である。それ故、新規蛋白質を結合した本発明の光親和性試薬は、新規開端蛋白質の構造及び機能解析に極めて有用なプローブ又は精製手段となることが期待されるのである。</p>

一般式 (VII) 中、R'、m、n、x 及び X' は、上記一般式 (IV) におけるものと同義を表し、Z 及び q は、上記一般式 (IV) におけるものと同義を表す。一般式 (VII) で示される化合物は、切断性スベーサーを有する結合でオチフラン基ニルシアリジンの化合物であり、特に X' がフェニレン基、q = 0 の化合物は、ラベル蛋白質の分離・回収に有用な光吸収性標識試薬を構成する化合物として好ましい。	一般式 (VII)	R'、m、n、x 及び X'	Z、q	上記一般式 (IV)	一般式 (IV)	X'	オチフラン基ニルシアリジン	切断性スベーサー	結合
〔0.2.3.1〕 一般式 (III) ～(IV) で示される化合物と反応させた結果では、通常多糖類、オルゴ糖類、单糖類、例えば、ムキ多糖類、Aspergillus 糖類、アシアル糖類、グリコサミノグリカン、ラクトサミン、N-アセチルラクトサミン、ダルカニン、マンナン、フルクタ	〔0.2.3.1〕	一般式 (III) ～(IV)	反応させた結果	多糖類、オルゴ糖類、单糖類	ムキ多糖類、Aspergillus 糖類	アシアル糖類、グリコサミノグリカン	ラクトサミン	N-アセチルラクトサミン	ダルカニン、マンナン、フルクタ
〔0.2.4〕 ルイス型四糖基、又はキトビオース複基が挙げられるが、下記機式圖に示す結合が可能な糖結合物であれば、これらに限定されない。即ち、本発明の一一般式 (III) で示される化合物において、R がアミノ基又はアミノ基の置換の結合物と還元末端を有する糖結合物との結合は選択的で、その結合は以下のように示される。	〔0.2.4〕	ルイス型四糖基、キトビオース複基	結合	R がアミノ基又はアミノ基の置換の結合物	本発明の一一般式 (III)	で示される化合物	R がアミノ基又はアミノ基の置換の結合物	と還元末端を有する糖結合物との結合	は選択的で、その結合は以下のように示される。
〔比15〕	〔比15〕	R	結合	R がアミノ基又はアミノ基の置換の結合物	と還元末端を有する糖結合物との結合	は選択的で、その結合は以下のように示される。	R がアミノ基又はアミノ基の置換の結合物	と還元末端を有する糖結合物との結合	は選択的で、その結合は以下のように示される。

は選択的  
【002

】 4] で、その結合は以下のように示される。

【0.0.2.5】本物において、R-結合物と、還元元素性であり、液相ではpH1～7で示さ  
る性質のアルデヒドリソウ化合物の一種としてオキシアミノ基を含む  
のオキシアミノ基を示す。また、まだ存在せしめる  
未端のアルデヒド基を示す。また、シップ塩基性を示す。

## [総合4] 発明の一般式(1)

化合物残基]— $\text{CHO}$ によって本装置は、その官能基と結合し得るのである。光触和剤はアルデヒドである。また、一般には、アルデヒドはその官能基と結合し得るのである。

(8)  $\text{O} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{CH}=\text{N}-\text{O}-[\text{V}^+]$

↑ ↓

$\text{CH}-\text{NH}-\text{O}-[\text{V}]$

れる化合物である化  
pH依存  
通常該反  
応式(1)  
般式(1)  
ルジアジ  
ーサーを  
有し、こ  
物の還元  
物を特に必  
要な結合物  
のするだけ  
～(VII)

ン化合物  
明の光親  
は、この  
は、促進剤  
式(1)～  
基以外に  
、難化合  
、ヒオキシ  
リガンド  
において

は、例えはジクロロメタンなどの溶媒中、不活性ガス雰

囲気下、-20°C付近でBBr<sub>3</sub>を作用させることにより化

合物(2)を生成する。生成した化合物(2)に、化合物(3)

を無水硫酸カリウムなどの塩基及びBu<sub>4</sub>N<sub>+</sub>などの相間移

動触媒の存在下反応させることにより、化合物(4)を生

成することができる。この反応は、 $\beta$ -ブチルカルボン酸(DiP)

中、不活性ガス雰囲気下、60°C付近で行うことができる。

なお、化合物(3)は、式P'N(H)(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, H<sub>5</sub>)。 $\beta$ -Brにおいて、m-n-2, P'が $\beta$ -ブチルカルボン酸である化合物であり、加熱中の方法(Y. Nakanaka, M. Has

himoto, Y. Kanbara, Bull. Natl. Chem. Class. 21, 1367-1375(199

4)により記載することができる。

【0029】化合物(4)は、例えはエタノールなどの溶

媒中、船底により室温付近で還元して化合物(5)とする

ことができる。還元反応生成物は、精製処理することな

く、次の反応に供することができる。生成した化

合物(5)は、四員化炭素とトリフォニルホスファインによ

り、例えはジクロロヘキサンなどの溶媒中でフリミ化する

ことにより、化合物(6)へ導く。この反応は、0°C付

近に冷却して行なうことが好ましい。化合物(6)は、 $\alpha$ -ビ

ドロキシフタルイミド無水硫酸カリウムなどの塩基の

下で還元させることにより、化合物(7)を得ることができる。この反応は、 $\beta$ -ブチルカルボン酸(DiP)などの溶媒

中、室温付近で行なうことができる。

【0030】次いで、図2に則り、化合物(7)をビオチ

ン化し、一般式(11)中、特に一般式(11)で示される

本新規化合物、即ち、國中化合物(8)～(10)の製造工程

を説明する。化合物(7)を用いることが好ましい。

ジクロロメタンなどの溶媒浴槽中、0°C付近で反応させ

た後、トリエチルアミン(Et<sub>3</sub>N)などの有機塩基の存在

下、例えはDMPなどの溶媒中、ビオチンのN-ヒドロキシ

化物(1)～(3)を室温付近で反

応させることによりビオテナン化した化合物(8)を得るこ

とができる。

【0031】化合物(8)に、例えはメタノール溶媒中

無水ヒドランを室温付近で用いさせることにより化合

物(9)を生成することができるが、この化合物(9)はカラ

ムクロマトグラフィーによる精製中に分離し難いので、

精製処理することなく次の反応に用いることが好まし

い。化合物(6)とヒドランの反応に用いることが好まし

い。化合物(9)をそのまま、例えはクロロホルムアセトニトリ

ルとの混合浴槽中で、トリエチルアミンなどの有機塩基

の存在下、ジ- $\alpha$ -ブチルジカルボン酸ナトリウム

(10)と室温付近で反応させることにより化合物(10)

を得ることができる。

【0032】更に、上記工程

で得たビオチン化フェニルジカルボン酸ナトリウム

を有する錯合物を導入し、一般式(1)中、特に一般式

(11)で示される本新規化合物、即ち化合物(12)～(16)

を生成することができる。化合物(10)に、トリフルオロ

カルステル(化合物21)とが素化ナトリウムなどの塩

を生成することができる。

化合物(10)に、トリフルオロ





溶媒を浴温し、0°Cで30分間攪拌した。0°Cに冷却し

ながら5N HCl 1.0, 1.5mLを加えてpH 3付近に調節した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を簡易和食塩水で洗浄して無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下で乾燥し、残渣をシリカゲルカラム(溶媒剤:クロロホルム:メタノール=5:1)で精製して9.9mg(8.9%)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C): δ=1.43(�H, s, -CCPh), 3.68-4.10(2H, m, -O-CH<sub>2</sub>-), 4.23(�H, s, -O-CH<sub>2</sub>-), 4.91(2H, s, Ph-CH<sub>2</sub>-), 5.67(1H, d, =H, J=8.1Hz, Ph-CH<sub>2</sub>-), 7.35(1H, d, =H, J=8.1Hz, Ph-CH<sub>2</sub>-) 8.17-8.23(�H, m, Ph-CH<sub>2</sub>-) 8.03(1H, vs, -NH)

【0064】実験例2 3 (化合物(2-6)+(2-7)→(2-8))

化合物(2-6) 7.2mg (0.1mmol) をジクロロメタントリメチル1mLに溶解し、N-ヒドロキシスルシンアミド 1.3mg (0.1 mmol) と DCC 2.3mg (0.1 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。

浴温を浴温まで残して、残渣をDMSO 1mLに溶解し、ビオチンヒドラジド (2-7) 1.0mmol を加え、室温で1時間攪拌した。反応液をシリカゲルカラム(浴温:クロロホルム:メタノール=5:1)で精製して1.0mgの淡黄色固体として化合物(2-8)を得た(収率: 10.6%)。

Positive ion FABMS (3-nitrobenzyl alcohol) m/z: z : 961 (M+H)<sup>+</sup>

【0065】実験例2 4 (化合物(1-1)→(2-9))

実験例9の方法で化合物(1-1) 3.5mg (5 μmol) から調製した化合物(1-1)とキトビオース 1.0mg (2.5 μmol) を実験例10と同様な条件下反応させた。同様にHPLC精製後、1.2 μmolの化合物(2-9)を得た(収率: 4.8%)。

HPLC 条件: 8.5% aq. CH<sub>3</sub>CN, 1 mL/min Positive ion FABMS (3-nitrobenzyl alcohol) m/z : 1011 (M+H)<sup>+</sup>, 1033 (M+Na)<sup>+</sup>

【0066】実験例2 5 (化合物(2-8)→(3-0))

実験例9の方法で化合物(2-8) 9.6mg (1.0μm) 0.1)を保護基し、キトビオース 2.1mg (5 μmol) を美濃朝1.0と同様な条件で反応させた。同様にHPLC精製後、1.0 μmolの化合物(3-0)を得た(収率: 2.2%)。

HPLC 条件: 90% aq. CH<sub>3</sub>CN→80% aq. CH<sub>3</sub>CN 20 min, 1 mL/min Positive ion FABMS (3-nitrobenzyl alcohol) m/z : 1286 (M+H)<sup>+</sup>, 1288 (M+Na)<sup>+</sup>

【0067】参考例2 (WGAの光親和性標識実験) 化合物(2-9)、化合物(3-0)の光親和性標識実験を参考例1と同様な方法で行った。0.1Mリン酸緩衝液、p 50

示す反応スキームの概略図である。

【図3】本発明の一般式(V)化合物を合成する一例を示す反応スキームの概略図である。

【図4】本発明の一一般式(V)化合物を合成する一例を示す反応スキームの概略図である。

\*

示す反応スキームの概略図である。

\*

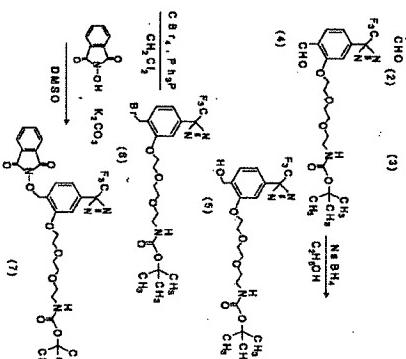
\*

H7.6中に、化合物(2-9)及び化合物(3-0)のいずれかの光親和性標識試薬 (0.1 mM) 及びWGA (小麦胚芽レケチン(wheat germ agglutinin)サブユニット濃度0.1 mM)、及ぶ光親和性標識試薬を各0.05mM調製した。別に対照試料として、化合物(2-9)及び化合物(3-0)のいずれかの光親和性標識試薬 (0.1 mM)、WGA (サブユニット濃度0.1 mM)、及びキトビオース 0.1 Mを含む0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.6を各0.05mL調製した。以上のようにして調製した、光親和性標識試薬及び対照試料を適光、長波長UVランプ (アーナコシ、XY-15) を用いて、上方5cmの距離から、氷上0°Cで1時間照射した。照射後の各試料は、常法は従い2% SDS-ポリアクリアミド電気泳動で分離後、PDIFF面に於いて化学发光解析により光標識バンドを検出した。对照実験により、分子量22KのWGAバンドの光標識が阻害されることから、標識はWGAに特異的であることを確認した。

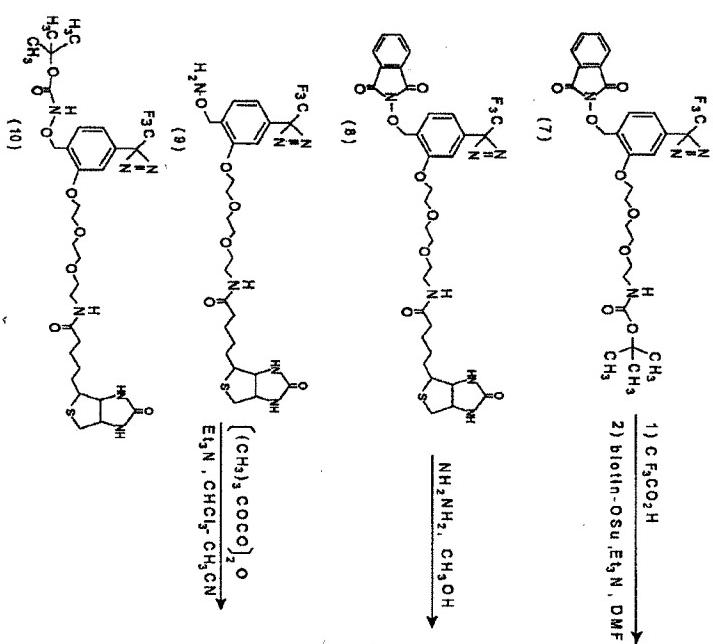
【0068】スペーサーの切断は、照射後の各試料 1.0 μLをとり、7Mグリニジン-EDTA 2 Na、10 mMを含む0.5Mトリス塩酸緩衝液、pH 8.5、1.0 μLに浴温し、0.7M DTI 10 μLを加えて45分2時間反応させた。さらに、1Mヨード酢酸ナトリウム 1.0 μLを加えて室温4時間、さらに4Mメルカバトエターネルを加えて5時間反応させた後、0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.6に対して透析した後、同様に電気泳動により解析した。切断反応後は、化合物(3-0)によりWGAラベルペンドの分子量22Kが消失することにより、切断を確認した。

【図1】本発明の一般式(I)で示される化合物、特にオキシアミニ基およびその導を有する上記化合物(I)は、還元末端を有する糖結合物に特別の保護処理を施すことなく、一段階で反応して光反応基(ジアゾジン)とヒドロキシル基を導くことができる。この一般式(V)の化合物は、光親和性標識試薬とし、糖と相互作用する蛋白質(糖受容体)のヒドロキシル基を保護するための安定した有用な化合物であり、しかも、該一般式(V)の化合物において、ヒドロキシル基(ヒドロキシル基)を介してフェニルシアリジン骨格に結合している化合物は、固定化アビシンからのラベル化した蛋白質の遊離・回収が容易である点で優れている。従つて、一般式(I)の化合物は、光親和性標識試薬を簡便に製造するための安定した有用な化合物であり、この一般式(I)の化合物の合成中間体である、一般式(I)の化合物も有用性の高い物質である。

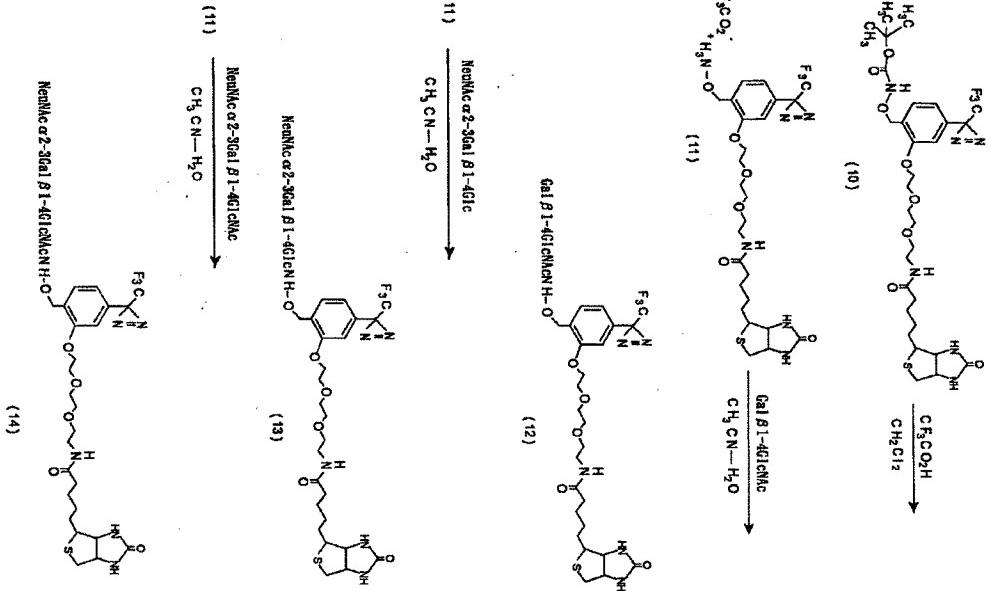
【図2】本発明の一一般式(I)化合物を合成する一例を示す反応スキームの概略図である。



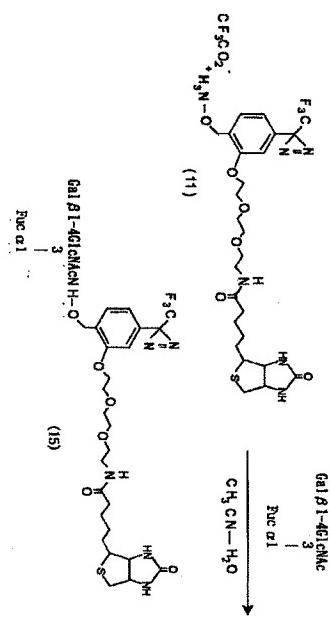
【図2】



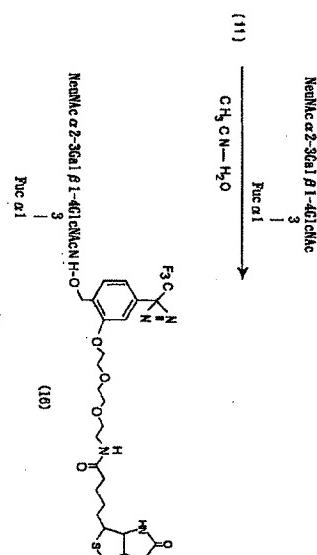
【図3】



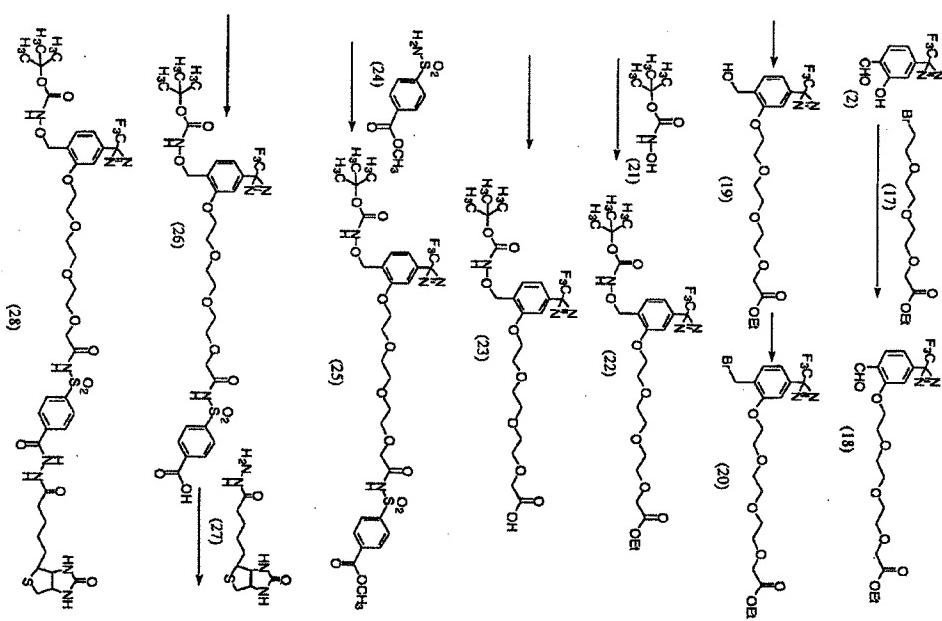
【図4】



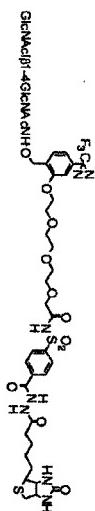
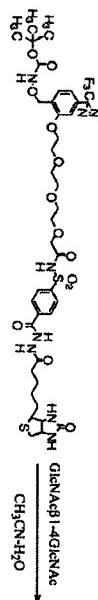
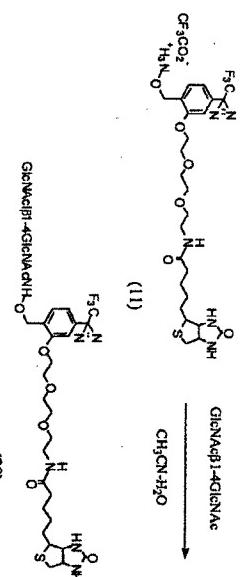
4



५१



[9]



フロントページの統一

51) Int.Cl. <sup>7</sup>		類別記号
G	O 1 N	F I
G	O 1 N	33/532
G	O 1 N	33/53
G	O 1 N	33/56
A		
U		

→-→-→ (参考)